

Rola antyporterów Na^+/H^+ w patogenezie nadciśnienia tętniczego i przewlekłych powikłań cukrzycy

The role of Na^+/H^+ exchangers in the pathogenesis of arterial hypertension and vascular complications of diabetes

BEATA TELEJKO

Klinika Endokrynologii, Diabetologii i Chorób Wewnętrznych Akademii Medycznej w Białymstoku

STRESZCZENIE: Antyportery Na^+/H^+ (NHE — sodium/proton exchanger) stanowią rodzinę białek błonowych, zadaniem których jest regulacja pH wewnątrzkomórkowego, objętości komórki oraz procesów wzrostu i różnicowania. W przedstawionej pracy omówiono mechanizm regulacji aktywności NHE oraz ich potencjalną rolę w patogenezie nadciśnienia tętniczego, nefropatii cukrzycowej, i oporności na działanie insuliny.

Słowa kluczowe: *Antyportery Na^+/H^+ — Nadciśnienie tętnicze — Cukrzyca — Nefropatia cukrzycowa*

SUMMARY: Na^+/H^+ exchangers (NHE — sodium/proton exchanger) constitute a family of membrane proteins which mediate cytosolic pH homeostasis, cell volume and proliferation activity. The authors of this review provide information about regulation of the activity and the potential role of NHE in the pathogenesis of arterial hypertension, diabetic nephropathy and insulin resistance.

Key words: *Na^+/H^+ exchangers — Arterial hypertension — Diabetes mellitus — Diabetic nephropathy*

75 chorych na cukrzycę umiera z powodu przewlekłych powikłań. Dlatego też stale poszukuje się nowych markerów, które mogłyby pomóc w wyodrębnieniu grupy pacjentów zagrożonych ich rozwojem, jeszcze przed ujawnieniem się objawów klinicznych. Od kilku lat uwagę w tej dziedzinie skupiają antyportery sodowo-protonowe. Dyskutowana jest ich rola w patogenezie nadciśnienia tętniczego, nefropatii cukrzycowej, a także insulinooporności.

Adres do korespondencji:

B. Telejko

Klinika Endokrynologii Akademii Medycznej w Białymstoku

ul. M. C. Skłodowskiej 24A

15-276 Białystok

tel/fax (085) 7447611

BEST AVAILABLE COPY

Znaczenie antyporterów Na^+/H^+ w fizjologii komórki

Antyportery Na^+/H^+ stanowią rodzinę białek błonowych, zadaniem których jest wymiana wewnątrzkomórkowych jonów H^+ na zewnątrzkomórkowe jony Na^+ [1, 2]. Ich rola fizjologiczna polega na regulacji pH wewnątrzkomórkowego i objętości komórki [1, 2]. Wymiana jonów H^+ na Na^+ chroni komórkę przed zakwaszeniem środowiska wewnętrznego. Ponadto zmiany pH wewnątrzkomórkowego (pH_i) mogą zapoczątkowywać kolejne fazy cyklu komórkowego, regulując procesy wzrostu i różnicowania [1, 2]. W komórkach nabłonka układu pokarmowego i kanalików nerkowych antyportery Na^+/H^+ są ponadto odpowiedzialne za reabsorpcję jonów sodu i anionów HCO_3^- [1].

Dotąd sklonowano sześć białek należących do rodziny antyporterów Na^+/H^+ , oznaczonych literami NHE1 – NHE6 (NHE – sodium/proton exchanger) [2, 4]. Są to glikofosfoproteiny o masie cząsteczkowej 74–93 kDa i zbliżonej sekwencji aminokwasowej (20–60% podobieństwa). Poszczególne izoformy są kodowane przez osobne geny, zlokalizowane w różnych rejonach genomu [2, 4]. Izoforma NHE1 występuje prawdopodobnie we wszystkich komórkach ssaków, odgrywając kluczową rolę w regulacji pH_i i objętości komórki. Promotor genu NHE1 ulega ponadto aktywacji pod wpływem wielu czynników mitogennych, co może oznaczać, że NHE1 jest izoformą regulującą procesy wzrostu i różnicowania. Izoformy NHE2, NHE3 i NHE4 występują w błonach plazmatycznych nabłonka przewodu pokarmowego i kanalików nerkowych, zapewniając stałą objętość komórek, niezależnie od ciśnienia osmotycznego. Izoformę NHE5 znaleziono w komórkach mózgu, śledziony, jąder i mięśni szkieletowych. Natomiast NHE6 jest białkiem wewnętrznej błony mitochondrialnej, występującym we wszystkich tkankach, a szczególnie w mózgu, mięśniach szkieletowych i mięśniu sercowym. Odgrywa ono kluczową rolę w regulacji objętości mitochondriów i stężenia wewnątrzkomórkowego jonów wapnia (Ca^{2+}) [2].

Regulacja aktywności antyporterów Na^+/H^+

Transport jonów przy udziale antyportera Na^+/H^+ odbywa się w sposób elektroneutralny (1:1) i zależy od chemicznego gradientu jonów Na^+ i H^+ w poprzek błony komórkowej [1, 2]. Sygnałem do „włączenia” antyportera jest spadek pH_i poniżej określonej – i różnej dla poszczególnych izoform NHE – wartości progowej, co powoduje natychmiastowe usuwanie nadmiaru jonów wodorowych z wnętrza komórki.

Aktywność antyporterów jest regulowana przez hormony, czynniki wzrostowe, zmiany stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} i H^+ , a także zmiany objętości komórki [2, 3, 4, 5, 6, 7].

Fosforylacja: Cząsteczki NHE zawierają miejsca potencjalnej fosforylacji przez białkową kinazę A (PKA) i C (PKC), kinazę kalmoduliny (CaM), kinazy Ser/Thr, kinazy MAPK (mitogen activated protein kinases) i kinazę p90^{rsk} [2, 3].

Białka regulatorowe: zaobserwowano wiązanie domeny cytoplazmatycznej NHE z kalmuliną, białkiem homologicznym z kalcyneuryną B (CHP – calcineurin B homolog protein), białkiem hsp70 oraz białkami NHERF i E3KARP, które biorą udział w regulacji aktywności HNE3 przez kinazę białkową zależną od c-AMP. Białko NHERF może również oddziaływać z receptorem β -adrenergicznym, po związaniu przez niego adrenaliny lub noradrenaliny [2, 5].

Białka wiążące GTP: W regulacji aktywności antyporterów Na^+/H^+ biorą także udział białka G ($\text{G}_{\alpha q}$, $\text{G}_{\alpha_{12}}$ i $\text{G}_{\alpha_{13}}$, onkogen Ras) – prawdopodobnie poprzez aktywację kinaz MAPK 42/44 kDa i kinazy MEK (mitogen/extracellular signaling kinase) [2, 5].

Produkty hydrolizy fosfatydyloinozytolu: Wykazano, że produkty hydrolizy 4,5-dwufosforanu fosfatydyloinozytolu aktywują NHE. Regulacja aktywności antyportera odbywa się zarówno poprzez IP_3 (1,4,5-trójfosforan inozytolu) i wzrost stężenia jonów Ca^{2+} w komórce, jak i cykl DAG (diacyloglicerol) – PKC. Natomiast do stymulacji NHE przez czynniki wzrostowe niezbędna jest aktywacja fosfatydyloinozytolo-3'kinazy [3, 5, 6, 7].

W płytkach krwi połączenie trombiny z receptorem w cząsteczce NHE powoduje aktywację białka G, napływ jonów Ca^{2+} , aktywację fosfolipazy A2, kaskady kwasu arachidonowego i wzmożoną produkcję tromboksanu A2 [2, 6, 7].

Natomiast receptory dla czynników wzrostowych, np. PDGF (płytkowego czynnika wzrostowego) posiadają wewnętrzną aktywność kinazy tyrozynowej [2, 3]. Wynikiem pobudzenia tego receptora jest fosforylacja reszt tyrozynowych białek, między innymi fosfolipazy C_γ , która hydrolizuje fosfatydyloinozytolo – 4,5-dwufosforan (PIP_2), generując IP_3 i DAG, co w efekcie aktywuje PKC i zwiększa poziom jonów Ca^{2+} .

ATP: Zauważono, że znaczne obniżenie poziomu ATP hamuje aktywność NHE. Prawdopodobnie nie jest to jednak efekt bezpośredni, a zależny od dodatkowych białek regulatorowych [2, 5].

Lipidy: Badania Nofera i wsp. [8] wykazały, że fizjologiczne stężenia lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) w sposób dawkozależny obniżają pH_i w płytkach krwi i hamują aktywność NHE indukowaną propionianem sodu i trombiną. Efekt ten był również widoczny w płytkach pozbawionych glikoproteiny GP IIb/IIIa (miejsce wiązania LDL) oraz GP IIIb (receptor dla oksydowanej cząsteczki LDL). Interesujące wydaje się, że równolegle pod wpływem LDL następowało nasilenie indukowanego przez trombinę rozpadu PIP_2 , ze wzrostem stężenia DAG, mobilizacją Ca^{2+} wewnątrzkomórkowego, reakcją degranulacji i agregacji płytek krwi [8]. Kochhar i wsp. [9] wykazali, że wzbogacenie błon plazmatycznych w cholesterol hamuje wymianę Na^+/H^+ . Istotnie, u pacjentów z rodzinną hipercholesterolemią stwierdzono [8] obniżenie pH_i w płytkach krwi, natomiast immunoselektywna afereza LDL powodowała $\uparrow \text{pH}_i$ i wzrost aktywności NHE. Inne badania [10] sugerują, że VLDL nie zmienia aktywności antyportera Na^+/H^+ , natomiast HDL wykazuje działanie przeciwstawne do LDL.

Insulina: Istnieją dowody [11, 12, 13, 14], że insulina ułatwiając transport glukozy, powoduje równolegle $\downarrow \text{pH}_i$ i wzrost aktywności NHE w adipocytach,

fibroblastach, miocytach i komórkach kanalików bliższych nerki. Ceolotto [15] i Pontremoli [16] zaobserwowali także, że insulina zwiększa V_{\max} dla NHE w erytrocytach. Efekt ten nie był jednak zależny od aktywności PKC [15]. Aktywacja PKC powodowała natomiast wzrost powinowactwa nośnika do jonów H^+ w bardziej zasadowym środowisku [15]. Natomiast Touyz [17] zaobserwował, że w płytkach krwi insulina wykazywała działanie dwukierunkowe: z jednej strony powodowała niewielki $\uparrow pH_i$ i $\uparrow Ca^{2+}$ wewnątrzkomórkowego, z drugiej zaś hamowała indukowany przez agonistów (angiotensyna II i endotelina 1) wzrost pH_i i Ca^{2+} w komórce. Efektu tego nie obserwowano u chorych z nadciśnieniem tętniczym [17].

Inne kationy: Powinowactwo jonów do miejsca wiążącego NHE przedstawia się jak: $H^+ > Li^+ > NH_4^+ > Na^+$ [2, 18]. Stosowana w badaniach *in vitro*, wywołująca doświadczalnie w erytrocytach wymiana Na^+/Li^+ , uważana jest powszechnie za odmianę funkcjonalną antyportera Na^+/H^+ . Jednak maksymalna aktywność wymiennicza Na^+/H^+ wynosi około 25–30 mmol/l/h/komórkę, podczas gdy szybkość wymiany zewnątrzkomórkowych jonów Na^+ na Li^+ jest 100 razy wolniejsza [18, 19]. Stąd Busch i Giordano [18, 19] sugerują, że wymiennicz Na^+/Li^+ odzwierciedla niską aktywność NHE w pH fizjologicznym (7.4), natomiast pomiar wymiany Na^+/H^+ dotyczy maksymalnej aktywności transportera.

Zmiana objętości komórki: W środowisku hiperosmotycznym zmniejszająca się objętość komórki powoduje aktywację wymiennicza Na^+/H^+ i napływ jonów sodowych (pęcznienie) [2, 5].

Leki: Aktywność NHE jest hamowana przez amiloryd i jego pochodne, związki benzoilguanidynowe (HOE694, HOE642 – Cariporide) oraz – w różnym stopniu – przez związki zawierające grupy imidazolinowe lub guanidynowe, jak cymetydyna, klonidyna i harmalina [2, 5, 15, 20].

Rola antyporterów Na^+/H^+ w patogenezie nadciśnienia tętniczego

Zwiększona aktywność NHE w płytkach krwi u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym została po raz pierwszy opisana przez Livne'go i wsp. [21]. Następnie zjawisko to potwierdziły doniesienia innych badaczy, dotyczące zarówno płytek krwi [22, 23, 24], jak i limfocytów [25], erytrocytów [26, 27, 28], leukocytów [29] oraz mięśni szkieletowych [30]. Natomiast Roskopf i wsp. [23] zaobserwowali, że wśród pacjentów z nadciśnieniem samoistnym można wyróżnić dwie subpopulacje: grupę charakteryzującą się wysoką (wzrost V_{\max}) oraz niską/normalną aktywnością NHE w płytkach krwi. Podobne zjawisko opisał Cannesa [27] w odniesieniu do krwinek czerwonych. Zarówno Aviv [31], jak i inni autorzy [15, 23] zgadzają się, że podwyższona aktywność NHE mogłaby być konsekwencją wzrostu stężenia wewnątrzkomórkowego Ca^{2+} lub stymulacji PKC. Roskopf [23] dowodzi jednak, że zjawisko to ma charakter pierwotny (genetycznie zdeterminowany?), niezależny od zmian wartości ciśnienia tętniczego i nie ulegający normalizacji pod wpływem leczenia hipotensyjnego (6-tygodniowe leczenie Enalaprelem). Również Giampietro [28], obserwując podwyższoną aktywność NHE w erytrocytach pacjentów z nadciśnieniem samoistnym, nie stwierdził zależności pomiędzy parametrami kinetycznymi

wymieniacza a wartościami ciśnienia tętniczego, grubością ściany naczyniowej w badaniu dopplerowskim oraz mikroalbuminurią. Aktywność antyportera korelowała natomiast dodatnio ze stężeniem frakcji LDL – cholesterolu [28]. Na podstawie dotychczasowych badań Siffert i Düsing [32] w roku 1996 wysunęli hipotezę, że u pacjentów z nadciśnieniem tętniczym następuje genetycznie uwarunkowany wzrost aktywności białek G (G_o i G_i), prowadzący do aktywacji antyportera NHE i – co za tym idzie – do wzmożonej gotowości skurczowej, zmian strukturalnych w naczyniach wynikających z przyspieszenia procesów wzrostu i proliferacji, przerostu lewej komory serca oraz do aktywacji płytek krwi.

W odróżnieniu od wyników Roskopf'a [23], Falkner i wsp. [33] wykazali zmniejszenie aktywności antyportera Na^+/H^+ po leczeniu inhibitorem konwertazy (Lisinopril) u pacjentów z nadciśnieniem samoistnym. Efekt ten potwierdził Gordan [34] po 12-tygodniowej terapii Captoprilem chorych na cukrzycę typu 2. Z drugiej strony, dane eksperymentalne wskazują, że działanie silnych czynników wazokonstrykcyjnych, jak angiotensyna II, łączy się ze wzrostem aktywności NHE w mięśniówce gładkiej naczyń [35].

Rola antyporterów Na^+/H^+ w patogenezie nefropatii cukrzycowej

Wielu autorów wykazało podwyższoną aktywność antyporterów Na^+/H^+ w komórkach pacjentów z cukrzycą typu 1 powikłaną nefropatią [36, 37, 38, 39, 40]. Uważają oni, że mógłby to być swoisty marker predyspozycji do rozwoju zmian nerkowych. O tym, że jest to zjawisko genetycznie uwarunkowane, świadczy podwyższona aktywność NHE, przetrwała po wielu podziałach mitotycznych w liniach komórkowych wywodzących się od fibroblastów [36] i limfoblastów [39] pobranych od chorych z nefropatią cukrzycową. Przy czym wykazano, że wzmożona aktywność antyportera w tych komórkach nie była wynikiem wzrostu ilości mRNA dla różnych izoform NHE, ale zwiększonego obrotu nośnika w błonie komórkowej [36, 39].

Dyskusyjny jest wpływ hiperglikemii na aktywność NHE w różnych typach komórek. Badania *in vitro* prowadzone przez Daviesa [39] wykazały, że umieszczenie limfoblastów pochodzących od pacjentów z nefropatią w środowisku o podwyższonym stężeniu glukozy (25 mmol/l) powodowało wzrost aktywności NHE (↑ obrotu nośnika) i nasilenie proliferacji komórek. Natomiast limfoblasty osób zdrowych i pacjentów z cukrzycą typu 1 nie powikłaną nefropatią, umieszczone w analogicznym medium, nie wykazywały aktywności proliferacyjnej i zwiększonego obrotu NHE [39]. Williams i wsp. [41] obserwowali, że miocyty szczura umieszczone na okres 3–24 godzin w środowisku hiperglikemicznym, wykazywały wzrost aktywności antyportera Na^+/H^+ . Efekt ten był blokowany przez inhibitory PKC [41]. Również Ng i wsp. [38] stwierdzili, że aktywność NHE w leukocytach osób z nefropatią cukrzycową była hamowana przez staurosporynę (inhibitor PKC). Interesujące, że efektu tego nie obserwowano u osób zdrowych i pacjentów bez cech nefropatii [38].

Wyniki badań klinicznych dotyczących wpływu różnych czynników na aktywność NHE u chorych z nefropatią są bardziej kontrowersyjne. Salles i wsp. [42] stwierdzili, że aktywność antyportera Na^+/H^+ w płytkach krwi u dzieci z cukrzycą, jakkolwiek podwyższona, nie była zależna od parametrów wydolności nerek, albuminurii oraz gospodarki lipidowej, korelowała natomiast ze stężeniem hemoglobiny glikowanej. Natomiast inni autorzy [40] nie potwierdzili związku podwyższonej aktywności NHE ze stopniem wyrównania metabolicznego cukrzycy. Giam-pietro i wsp. [43] obserwowali podwyższoną aktywność NHE w erytrocytach pacjentów z cukrzycą typu 1, niezależnie od współistniejącej nefropatii, nadciśnienia tętniczego, albuminurii i gospodarki lipidowej. Ci sami autorzy zasugerowali również, że różnice w doniesieniach dotyczących NHE mogą wynikać z odmiennej kinetyki tego nośnika w różnych typach komórek. I tak, w pH fizjologicznym NHE w błonie erytrocytarnej jest praktycznie nieaktywny, natomiast w leukocytach wymiana Na^+/H^+ przebiega nadal [43]. Natomiast Davies uważa, że w nefropatii cukrzycowej ma miejsce potranslacyjna modyfikacja aktywności antyporterów Na^+/H^+ poprzez bezpośrednią fosforylację, glikację domen N-końcowych lub/i wzrost aktywności cyklu DAG – PKC [39].

Badania dotyczące aktywności antyporterów Na^+/H^+ w cukrzycy typu 2

Literatura dotycząca antyporterów Na^+/H^+ w cukrzycy typu 2 [34, 44, 45, 46, 47] nie jest tak bogata, jak piśmiennictwo na temat NHE u pacjentów z cukrzycą typu 1 i nadciśnieniem tętniczym. Foyle i wsp. [44] nie zaobserwowali wzmożonej aktywności NHE w płytkach krwi u pacjentów z cukrzycą typu 2, niezależnie od współistniejącego nadciśnienia, mikroalbuminurii, zaburzeń lipidowych oraz wartości BMI. Natomiast Herman [45] stwierdził wzrost aktywności NHE – mierzonej pośrednio poprzez pęcznienie komórek – u chorych z cukrzycą typu 2 i cechami nefropatii, w odniesieniu do pacjentów z normoalbuminurią. Giordano i wsp. [34] również nie obserwowali zmienionej aktywności NHE w erytrocytach chorych z cukrzycą typu 2. Nie stwierdzili oni także różnic w aktywności antyportera w trakcie wlewu insuliny (techniką klamrową), zarówno u osób zdrowych, jak i chorych na cukrzycę. Wykazali oni natomiast, że 12-tygodniowe leczenie Captoprilem zmniejsza aktywność NHE w błonie erytrocytarnej. Działania takiego nie wykazywała Doksazosyna i Nifedypina [34].

W badaniach własnych [47] obserwowaliśmy zwiększoną aktywność antyportera Na^+/H^+ w płytkach krwi, zarówno w cukrzycy typu 1, jak i 2, szczególnie powikłanej nadciśnieniem tętniczym, niezależnie od współistniejącej mikroalbuminurii lub białkomoczu. Stwierdziliśmy natomiast korelację pomiędzy aktywnością wymiennicza Na^+/H^+ i aktywnością prokoagulacyjną płytek krwi w badanej grupie.

Rola antyporterów Na^+/H^+ w insulinooporności i zespole metabolicznym

Pomimo, że badania kliniczne nie wykazały jednoznacznie podwyższonej aktywności NHE u pacjentów z cukrzycą typu 2 i zespołem metabolicznym, Ruiz-Palomo

i Toledo [35] wysunęli hipotezę, że wspólnym ogniwem patogenetycznym cukrzycy, otyłości i nadciśnienia, wchodzących w skład zespołu X, mogą być zaburzenia transportu błonowego elektrolitów, dotyczące między innymi antyporterów Na^+/H^+ w komórkach beta wysp trzustkowych i komórkach docelowych dla insuliny. Podstawę do sformułowania tej hipotezy stanowił fakt, że:

- wiele enzymów i przekazników modulujących aktywność NHE (PKC, fosfolipaza C, IP_3 , sygnał wapniowy) ma również udział w regulacji sekrecji i działania insuliny [48, 49]
- prawidłowa sekrecji i działanie insuliny wymaga optymalnego zakresu stężeń Ca^{2+} w komórce (140–370 nM), zaś NHE jest jednym z mechanizmów regulujących Ca^{2+} , i zarazem oddziałujących na zmiany jego stężenia [50, 51].

Ci sami autorzy [35] wysunęli także przypuszczenie, że rozrost i przerost adipocytów u chorych otyłych mogłyby być związane z podwyższoną aktywnością antyporterów Na^+/H^+ w tkance tłuszczowej (zwiększenie objętości komórek i inicjacja procesów wzrostowych).

Podsumowanie

Obecność różnych izoform NHE we wszystkich komórkach organizmu, udział w tak ważnych procesach, jak utrzymanie homeostazy wewnątrzkomórkowej oraz złożona regulacja aktywności za pośrednictwem hormonów, czynników wzrostowych oraz środków farmakologicznych, czynią tę grupę białek szczególnie atrakcyjną nie tylko w poszukiwaniu markerów genetycznej predyspozycji do wystąpienia cukrzycy i nadciśnienia tętniczego, ale także w prewencji przewlekłych powikłań narządowych.

Piśmiennictwo

1. Grinstein S, Rotin D, Mason MJ. Na^+/H^+ exchange and growth factor – induced cytosolic pH changes. Role in cellular proliferation. *Biochim Biophys Acta* 1989; **988**: 73–97.
2. Orlowski J, Grinstein S. Na^+/H^+ exchangers in mammalian cells. *J Biol Chem* 1997; **272**: 22373–22376.
3. Sardet C, Counillon L, Franchi A. Growth factors induce phosphorylation of the Na^+/H^+ antiporter, a glycoprotein of 110 kDa. *Science* 1990; **247**: 723–726.
4. Orlowski J, Kandasamy RA, Shull GE. Molecular cloning of putative members of the Na/H exchanger gene family. *J Biol Chem* 1992; **267**: 9331–9339.
5. Grinstein S, Rothstein A. Mechanisms of regulation of the Na-H exchanger. *J Membr Biol* 1986; **90**: 1–12.
6. Siffert W, Siffert G, Scheid P, Akkerman JWN. Na^+/H^+ exchange modulates Ca^{2+} mobilisation in human platelets stimulated by ADP and the thromboxane mimetic U46619. *J Biol Chem* 1990; **264**: 719–725.
7. Siffert W. Regulation of platelet function by sodium – hydrogen exchange. *Cardiovasc Res* 1995; **29**: 160–166.
8. Nofer JR, Tepel M, Kehrel B, Wierwille S, Walter M, Seedorf U, Zidek W, Assmann G. Low – density lipoproteins inhibit the Na^+/H^+ antiport in human platelets. *Circulation* 1997; **95**: 1370–1377.
9. Kochhar N, Kaul D. Molecular link between membrane cholesterol and Na^+/H^+ exchange within human platelets. *FEBS Lett* 1992; **229**: 19–22.

10. Nofer JR, Tepel M, Kehrel B, Wierwille S, Walter M, Seedorf U, Assmann G, Zidek W. High density lipoproteins enhance the Na^+/H^+ antiport in human platelets. *Thromb Haemost* 1996; 75: 635–641.
11. Arsenis G, Spencer BA. Regulation of Na^+/H^+ exchange in rat adipocytes; effects of insulin. *Endocrinology* 1995; 136: 1920–1927.
12. Gesek FA, Schoolwerth AC. Insulin increases Na^+/H^+ exchange activity in proximal tubules from normotensive and hypertensive rats. *Am J Physiol* 1991; 260: F695–F703.
13. Klip A, Ramlal T, Koivisto U. Stimulation of Na^+/H^+ exchange by insulin and phorbol ester during differentiation of 3T3-L1 cells. Relation to hexose uptake. *Endocrinology* 1988; 123: 296–304.
14. Klip A, Ramlal T, Cragoe Jr EJ. Insulin – induced cytoplasmic alkalization and glucose transport in muscle cells. *Am J Physiol* 1986; 250: C720–C728.
15. Ceolotto G, Conlin P, Clari G, Semplicini A, Canessa M. Protein kinase C and insulin regulation of red blood cell Na^+/H^+ exchange. *Am J Physiol* 1997; 272 (Cell Physiol 41): C818–C826.
16. Pontremoli R, Zerbini G, Rivera A, Canessa M. Insulin activation of red blood cell Na^+/H^+ exchange decreases the affinity of sodium sites. *Kidney Int* 1994; 46: 365–373.
17. Touyz RM, Schiffrin EL. Blunted inhibition by insulin of agonist – stimulated calcium, pH and aggregatory responses in platelets from hypertensive patients. *J Hypertens* 1994; 12: 1255–1263.
18. Canessa M, Morgan K, Semplicini A. Genetic differences in sodium – lithium exchange and regulation of the sodium – hydrogen exchanger in essential hypertension. *J Cardiovasc Pharmacol* 1988; 12(suppl. 3): S92–S98.
19. Busch S, Buckhardt BC, Siffert W. Expression of the human sodium/proton exchanger NHE-1 in *Xenopus laevis* oocytes enhances sodium/proton exchange activity and establishes sodium/lithium countertransport. *Pflügers Arch* 1995; 429: 859–869.
20. Klein HH, Pich S, Bohle RM, Lindert-Heimberg S, Nebendahl K. Na^+/H^+ exchange inhibitor cariporide attenuates cell injury predominantly during ischemia and not at onset of reperfusion in porcine hearts with low residual blood flow. *Circulation* 2000; 102: 1977–1982.
21. Livne A, Veitch R, Grinstein S, Balfe JW, Marquez-Julio A, Rothstein A. Increased platelet Na^+/H^+ exchange rates in essential hypertension: application of a novel test. *Lancet* 1987; I: 533–536.
22. Roskopf D, Morgenstern E, Scholz W, Osswald U, Siffert W. Rapid determination of the elevated Na^+/H^+ exchange in platelets of patients with essential hypertension using an optical swelling assay. *J Hypertens* 1991; 9: 231–238.
23. Roskopf D, Siffert G, Osswald U, Witte K, Dusing R, Akkerman JWN, Siffert W. Platelet Na^+/H^+ exchanger activity in normotensive and hypertensive subjects: effect of enalapril therapy upon antiport activity. *J Hypertens* 1992; 10: 839–847.
24. Schmouder RL, Weder AB. Platelet sodium – proton exchange is increased in essential hypertension. *J Hypertens* 1989; 7: 325–330.
25. Wehling M, Kasmayr J, Theisen K. The Na^+/H^+ exchanger is stimulated and cell volume increased in lymphocytes from patients with essential hypertension. *J Hypertens* 1991; 9: 519–524.
26. Orlov SN, Postnov IY, Pokudin NI, Kukharensko VY, Postnov YV. Na^+/H^+ exchange and other ion – transport systems in erythrocytes of essential hypertensives and spontaneously hypertensive rats, a comparative analysis. *J hypertens* 1989; 7: 781–788.
27. Canessa M, Morgan K, Goldszer R, Moore TJ, Spalvins A. Kinetic abnormalities of the red blood cell sodium – proton exchange in hypertensive patients. *Hypertension* 1991; 17: 340–348.
28. Giampietro O, Matteucci E, catapano G, Dell'Omo G, Talarico L, Di Muro C, Di Bello V, Pedrinalli R. Microalbuminuria and erythrocyte sodium – hydrogen exchange in essential hypertension. *Hypertension* 1995; 25: 981–985.
29. Ng LL, Fennell DA, Dudley C. Kinetics of the human leukocyte $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ antiport in essential hypertension. *J Hypertens* 1989; 8: 533–537.
30. Dudley CRK, Taylor DJ, Ng LL, Kemp J, Ratcliffe PJ, Radda GK. Evidence for abnormal Na^+/H^+ antiport activity detected by phosphorus nuclear magnetic resonance spectroscopy in exercising skeletal muscle of patients with essential hypertension. *Clin Sci* 1990; 79: 491–497.

31. Aviv A, Livne A. The Na^+/H^+ antiport, cytosolic free Ca^{2+} , and essential hypertension: a hypothesis. *Am J Hypertens* 1988; 1: 410–413.
32. Siffert W, Düsing R. Na^+/H^+ exchange in hypertension and in diabetes mellitus – facts and hypotheses. *Basic Res Cardiol* 1996; 91: 179–190.
33. Falkner B, Canessa M, Anzalone D. Effect of angiotensin converting enzyme inhibitor (Lisinopril) on insulin sensitivity and sodium transport in mild hypertension. *Am J Hypertens* 1995; 8: 454–460.
34. Giordano M, Castellino P, Solini A, Canessa ML, DeFronzo RA. Na^+/Li^+ and Na^+/H^+ countertransport activity in hypertensive non – insulin – dependent patients: role of insulin resistance and antihypertensive treatment. *Metabolism* 1997; 46: 1316–1323.
35. Ruiz-Palomo F, Toledo T. Primary Na^+/H^+ exchanger dysfunction: a possible explanation for insulin resistance syndrome. *Medical Hypotheses* 1993; 41: 186–189.
36. Siczkowski M, Davies JE, Sweeney FP, Kofoed-Enevoldsen A, Ng LL. Na^+/H^+ exchanger isoform – 1 abundance in skin fibroblasts of type 1 diabetic patients with nephropathy. *Metabolism* 1995; 44: 791–795.
37. Ng LL, Simmons D, Frighi V. Leukocyte Na^+/H^+ antiport activity in type 1 (insulin – dependent) diabetic patients with nephropathy. *Diabetologia* 1990; 33: 371–377.
38. Ng LL, Simmons D, Frighi V, Garrido MC, Bomford J. Effect of protein kinase C modulators on the leukocyte Na^+/H^+ antiport in type 1 (insulin – dependent) diabetic patients with albuminuria. *Diabetologia* 1990; 33: 278–284.
39. Davies JE, Siczkowski M, Sweeney F, Quinn PA, Krolewski B, Krolewski AS, Ng LL. Glucose – induced changes in turnover of Na^+/H^+ exchanger of immortalized lymphoblasts from type 1 diabetic patients with nephropathy. *Diabetes* 1995; 44: 382–388.
40. Barbe P, Salles JP, Barthe P, Louvet JP, Chap H. Increased platelet sodium – proton exchange rates in insulin – dependent (type 1) diabetic patients with nephropathy and hypertension. *Mol Cell Biochem* 1992; 109: 167–172.
41. Williams B, Howard RL. Glucose – induced changes in Na^+/H^+ antiport activity and gene expression in cultured vascular smooth muscle cells: the role of protein kinase C. *J Clin Invest* 1994; 93: 2623–2631.
42. Salles JP, Ser N, Fauvel J, Couvaras O, Bouissou F, Ghisolfi J, Barthe P, Chap H. Platelet Na^+/H^+ exchange in juvenile diabetes mellitus. *J hypertens* 1991; 9(suppl 6): S222–S223.
43. Giampietro O, Matteucci E, Pedrinelli R. Erythrocyte sodium – hydrogen exchange and microalbuminuria in type 1 diabetes. *Diabetes care* 1996; 19: 993–997.
44. Foyle WJ, Fernandez M, Denver E, Sampson MJ, Pinkney J, Yudkin JS. Cellular sodium – membrane transport and cardiovascular risk factors in non – insulin dependent diabetes mellitus. *Metabolism* 1996; 45: 961–965.
45. Herman WH, Prior DE, Yassine MD. Nephropathy in NIDDM is associated with cellular markers for hypertension. *Diabetes Care* 1993; 16: 815–818.
46. Zaidi KF, Yudkin JS. Characteristics of the sodium/hydrogen exchange in non – insulin dependent diabetic patients with microalbuminuria and hypertension. *Clin Sci* 1996; 90: 13–19.
47. Telejko B, Tomasiak M, Stelmach H, Kinalska I. An association between an increased platelets Na^+/H^+ exchanger activity and the availability of platelet factor 3 in diabetic patients – the role in procoagulant activity. *Diabetologia* 2000; 43 (suppl. 1): A74.
48. Metz SA. Lipooxygenase inhibitors reduce insulin secretion without impairing calcium mobilisation. *Endocrinology* 1987; 120: 2534–2540.
49. Metz SA. Arachidonic acid and its metabolites: evolving roles as transmembrane signals for insulin release. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 1988; 32: 187–196.
50. Draznin B. Cytosolic calcium: A new factor in insulin resistance. *Diabetes Res Clin Pract* 1991; 11: 141–147.
51. Draznin B, Sussman K, Kao M, Lewis D, Sherman N. The existence of an optimal range of cytosolic free calcium for insulin – stimulated glucose transport in rat adipocytes. *J Biol Chem* 1987; 262: 14385–14391.

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.